

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-051783

(43)Date of publication of application : 19.02.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 21/78
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/569
G01N 33/58

(21)Application number : 2000-241500

(71)Applicant : DENSO CORP

(22)Date of filing : 09.08.2000

(72)Inventor : FUKUDA HIROAKI

OKAMOTO YASUSHI

(54) METHOD OF DETECTION/DETERMINATION FOR EUBACTERIA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for rapidly detecting/determining all the microbial species belonging to eubacteria.

SOLUTION: This method is a method for detecting/determining only specific species in various eubacteria groups and includes the following steps: (1) a polymerase chain reaction which uses a probe obtained by adding a fluorescent pigment to an oligonucleotide containing the sequence of 104th to 126th from the sense side of a DNA sequence encoding 16S rRNA in eubacteria on the numbering of the DNA sequence encoding 16S rRNA in *Escherichia coli* or its complementary sequence and a primer designed on the basis of a variation domain sequence present in the upstream and downstream sides of the above probe; and (2) a measurement for fluorescence intensity on the fluorescence wavelength of the changed probe.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] In numbering of the DNA array which are detection and the approach of carrying out a quantum only about the specific kind in various eubacterium groups, and carries out the code of the 16SrRNA(s) of the following step:(1) Escherichia coli (Escherichia coli) The probe which added the fluorochrome to the oligonucleotide which counts from the sense side of DNA which carries out the code of the 16SrRNA(s) of an eubacterium, and includes the 104th to the 126th array, or its complementary sequence, Said approach containing measurement; of the fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which carried out polymerase chain reaction; using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and (2) change.

[Claim 2] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are a bacillus (Bacillus) group, a Staphylococcus (Staphylococcus) group, and the bacteria of the close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 1.

[Claim 3] An oligonucleotide given in the array number 1.

[Claim 4] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 3 used for an approach according to claim 2.

[Claim 5] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are a BUREBI bacillus (Brevibacillus) group, a PAENI bacillus (Paenibacillus) group, and the bacteria of the close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 2.

[Claim 6] An oligonucleotide given in the array number 2.

[Claim 7] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 6 used for an approach according to claim 5.

[Claim 8] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are an Actinobacillus (Actinobacillus) group and the bacteria of the close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 3.

[Claim 9] An oligonucleotide given in the array number 3.

[Claim 10] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 9 used for an approach according to claim 8.

[Claim 11] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are the bacteria of the Mycobacterium (Mycobacterium) group, the Corynebacterium (Corynebacterium) group, an actinomyces (Actinomyces), a streptomyces (Streptomyces), Rhodococcus (Rhodococcus), and its close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 4.

[Claim 12] An oligonucleotide given in the array number 4.

[Claim 13] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 12 used for an approach according to claim 11.

[Claim 14] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are a Legionella (Legionella) group and the bacteria of the close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 5.

[Claim 15] An oligonucleotide given in the array number 5.

[Claim 16] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 15 used for an approach according to claim 14.

[Claim 17] The approach according to claim 1 are the bacteria of the close relationship group, and the aforementioned oligonucleotide includes an array given in the array number 6 in the bacteria and Escherichia coli (Escherichia coli) list of the Pseudomonas (Pseudomonas) group whose aforementioned specific kind is the cause bacillus of septicemia, a Staphylococcus (Staphylococcus) group, and a klebsiella (Klebsiella) group.

[Claim 18] An oligonucleotide given in the array number 6.

[Claim 19] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 18 used for an approach according to claim 17.

[Claim 20] The aforementioned specific kind An acetobacter (Acetobacter) group, The Agrobacterium (Agrobacterium) group, a BURADEHIDOBIMU (Bradyrhizobium) group, The Caulobacter (Caulobacter) group, the Gluconobacter (Gluconobacter) group, They are the bacteria belonging to alpha group of purple nonsulfur bacteria (Proteobacteria), such as a Paracoccus (Paracoccus) group and a rhizobium (Rhizobium) group. And the approach according to claim 1 the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 7.

[Claim 21] An oligonucleotide given in the array number 7.

[Claim 22] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 21 used for an approach according to claim 20.

[Claim 23] The approach according to claim 1 the aforementioned specific kinds are the bacteria belonging to beta group of purple nonsulfur bacteria (Proteobacteria), such as an alkali gene (Alcaligenes) group, a BORUDETORA (Bordetella) group, a sphaerotilus (Sphaerotilus) group, and a SUPIRIRAMU (Spirillum) group, and the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 8.

[Claim 24] An oligonucleotide given in the array number 8.

[Claim 25] The probe reagent containing an oligonucleotide according to claim 23 used for an approach according to claim 23.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] The invention in this application relates to the probe which uses the various eubacteria by polymerase chain reaction (it abbreviates to PCR hereafter) for detection, the approach of carrying out a quantum, and the approach concerned. Detection and the quantum of various kinds of microorganisms are performed in other fields including the medical field. Especially detection and the quantum of the bacteria which cause infectious diseases, such as tuberculosis and septicemia, are important. This invention relates to the detection and the quantum approach using the probe for detection and the quantum of the various eubacteria containing the bacteria which cause an infectious disease, and the probe concerned.

[0002]

[Description of the Prior Art] Generally various things, such as an approach using separation by the selective medium, growth by the growth medium, microscope observation, or immunological reactivity, are used for detection and identification of bacteria. Actuation of these detection / identification approaches needs great time amount and skill. Although the need for skillful fell by development of the kit which specifies a strain based on chemical description, the problem which culture takes time amount is not yet solved.

[0003] In recent years, the technique of detecting and identifying the bacillus concerned by making the gene of various bacteria into a target was developed. By this technique, large time amount compaction is possible in detection and identification of a bacillus. The examples of such a gene are 16S RIBOSOMAL gene (it abbreviates to 16SrRNA array hereafter) indicated in patent No. 2552787, JP,5-78319,B, JP,8-297,A, and JP,10-191982,A, and a heat shock protein specific to a bacillus indicated during patent No. 2540023.

[0004] Although the primer which detects *Mycobacterium* is offered, there are also many the classes and, as for patent No. 2540023, the quantitative analysis of them is impossible. It is the approach prepare a magnification fragment in patent No. 2552787 using a specific primer to the *Mycobacterium* bacteria, and concomitant use with restriction enzyme processing and hybridization of a probe detects only a tubercle-bacillus group. Although this approach enables detection of a tubercle-bacillus group, it does not have quantum nature and can offer only inadequate information. JP,10-191982,A is indicating the approach of detecting *legionella* bacteria, to *legionella* bacteria with the specific probe (numbering of a base sequence 871-890 and an *Escherichia coli* 16SrRNA array). Although *legionella* bacteria is detectable by this approach with hybridization, since it is easy to be influenced of a background, sensibility is low. Although JP,8-297,A is indicating the oligonucleotide primer for detecting a nucleic-acid target sequence characteristic of an eubacterium by PCR or chain permutation magnification (solvent deasphalting), it cannot perform species-specific detection by this approach. As mentioned above, although various techniques of detecting a specific bacillus, a specific eubacterium, etc. have been established, neither of these techniques can carry out the quantum of the specific bacillus quickly. furthermore, the time of carrying out the quantum of the specific bacillus -- a bacillus -- although a specific probe may be used -- such a bacillus specific probe -- the singularity -- therefore, since there is no versatility, in order to carry out the quantum of the various bacilli, there is a problem that various probes are needed.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The technical problem of the invention in this application is establishing quickly detection and the technique which carries out a quantum for all the strains belonging to an eubacterium, and is designing the high probe of versatility between the strains concerned in a comparatively highly preservable field between the strains inserted into the fluctuation field which can design a strain specific primer especially based on it. And it is also the technical problem of this invention to perform detection and the quantum of a specific bacillus quickly by performing quantitative PCR using the high probe of the versatility which starts a specific primer and the specific invention in this application for every strain.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The invention in this application is detection and the approach of carrying out a quantum only about the specific kind in various eubacterium groups. In numbering of the DNA array which carries out the code of the 16SrRNA(s) of the following step:(1) *Escherichia coli* (*Escherichia coli*) The probe which added the fluorochrome to the oligonucleotide which counts from the sense side of the DNA array which carries out the code of the 16SrRNA(s) of an eubacterium, and includes the 104th to the 126th array, or its complementary sequence, Said approach containing measurement; of the fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which carried out polymerase chain reaction; using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and (2) change is offered.

[0007] The voice of 1 of the invention in this application -- it sets like, and the aforementioned specific kinds are a bacillus (*Bacillus*) group, a *Staphylococcus* (*Staphylococcus*) group, and the bacteria of the close relationship group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 1 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide given in the array number 1 and said approach is also offered.

[0008] A probe including the array shown in the array number 1 can be hybridized in 16SrRNA array of the bacteria of *Bacillus* or a *Staphylococcus* group. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further all the strains of *Bacillus* and a *Staphylococcus* group in a detail The following strains For example, detection, :bacillus ARUKARO philus which can carry out a quantum (*Bacillus alcalophilus*), *Bacillus amyloliquefaciens* (*Bacillus amyloliquefaciens*), *Bacillus badius* (*Bacillus badius*), *bacillus KARUDORI* tee dregs (*Bacillus caldolyticus*), *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus*), *bacillus cohnii* (*Bacillus cohnii*), A *bacillus* fur mass (*Bacillus firmus*) and *bacillus* in *SORITASU* (*Bacillus insolitus*), *bacillus* cow *SUTOFIRASU* (*Bacillus kaustophilus*) and *bacillus* Wren -- *TASS* (*Bacillus lentus*), *BACHISURU* *RIKENIFUORUMISU* (*Bacillus licheniformis*), and [0009] *Bacillus* megger *TERIJUMU* (*Bacillus megaterium*), *Bacillus* *MECHINORIKASU* (*Bacillus methenolicus*), *Bacillus* *PARIDASU* (*Bacillus pallidus*) and *bacillus* *POPIRIE* (*Bacillus popilliae*), *Bacillus* *PUMIRASU* (*Bacillus*

pumilus) and bacillus Sumi Chee (Bacillus smithii), Bacillus stearothermophilus (Bacillus stearothermophilus), Bacillus subtilis (Bacillus subtilis) and a bacillus thermostat AMIROBO lance (Bacillus thermoamylorans), Bacillus thermostat dent RIFIKANSU (Bacillus thermodenitrificans), Bacillus thermostat guru KOSHIDASHIUSU (Bacillus thermoglucoSIDASius), A bacillus thermostat REOBO lance (Bacillus thermoleovorans), bacillus BEDERI (Bacillus vedderi), KARORAMATA fur BIDASU (Caloramator fervidus), and [0010] Clostridium fur BIDASU (Clostridium fervidus), KURUSHIA gib SONII (Kurthia gibsonii) and the Lactobacillus brevis (Lactobacillus brevis), Soccer ROKOKKASU thermostat philus (Saccharococcus thermophilus), Ape cinae flos Ben Tori Curie (Sarcina ventriculi), Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus), Staphylococcus EPIDAMIDISU (Staphylococcus epidermidis) and Staphylococcus HOMINISU (Staphylococcus hominis).

[0011] In other modes of the invention in this application, the aforementioned specific kinds are a BUREBI bacillus (Brevibacillus) group, a PAENI bacillus (Paenibacillus) group, and the bacteria of the close relationship group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 2 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 2 is also offered.

[0012] A probe including the array shown in the array number 2 can be hybridized in 16SrRNA array of bacteria, such as BUREBI Bacillus and PAENI Bacillus. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further all the strains of BUREBI Bacillus or PAENI Bacillus in a detail The following strains For example, detection and :BUREBI bacillus Agree (Brevibacillus agri) who can do a quantum, BUREBI bacillus bolus TERENSHISU (Brevibacillus borstelensis), BUREBI Bacillus brevis (Brevibacillus brevis), BUREBI bacillus cent loss PORASU (Brevibacillus centrosporus), BUREBI bacillus KOSHINENSHISU (Brevibacillus choshinensis), BUREBI bacillus FORUMOSASU (Brevibacillus formosus), BUREBI bacillus radio-and-TV loss PORASU (Brevibacillus laterosporus), BUREBI bacillus PARABUREBISU (Brevibacillus parabrevis), and [0013] BUREBI bacillus REUSUZERI (Brevibacillus reuszeri), A BUREBI bacillus sir mol bar (Brevibacillus thermoruber), PAENI bacillus AHIBENSHISU (Paenibacillus ahibensis), PAENI bacillus Al Bay (Paenibacillus alvei), PAENI bacillus AMIRORI tee dregs (Paenibacillus amyloyticus), PAENI bacillus APIARIJUSU (Paenibacillus apiarius), PAENI bacillus azo TOFIKUSANSU (Paenibacillus azotofixans), PAENI bacillus KONDOROICHINASU (Paenibacillus chondroitinus), PAENI bacillus card RANORI tee dregs (Paenibacillus curdlanolyticus), A PAENI bacillus day ram (Paenibacillus durum), PAENI bacillus guru KANORI tee dregs (Paenibacillus glucanolyticus), PAENI bacillus Illinois SENS HISU (Paenibacillus illinoiensis), PAENI bacillus KOBENSHISU (Paenibacillus kobensis), PAENI bacillus RARUBAE (Paenibacillus larvae), A PAENI Bacillus macerans (Paenibacillus macerans), PAENI bacillus MAKUARI en cis- (Paenibacillus macquariensis), PAENI bacillus PABURI (Paenibacillus pabuli), PAENI bacillus PEORIE (Paenibacillus peoriae), A PAENI bacillus poly mixer (Paenibacillus polymyxa), PAENI bacillus thia MINORI tee dregs (Paenibacillus thiaminolyticus) and PAENI bacillus BARJDASU (Paenibacillus validus).

[0014] In other modes of the invention in this application, the aforementioned specific kinds are an Actinobacillus (Actinobacillus) group and the bacteria of the close relationship group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 3 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 3 is also offered.

[0015] A probe including the array shown in the array number 3 can be hybridized in 16SrRNA array of bacteria, such as Actinobacillus. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further all the strains of Actinobacillus in a detail The following strains For example, detection, :Actinobacillus KAPUSURATASU which can carry out a quantum (Actinobacillus capsulatus), Actinobacillus EKURI (Actinobacillus equuli), Actinobacillus HOMINISU (Actinobacillus hominis), Actinobacillus in DORIKASU (Actinobacillus indolicus), Actinobacillus rig NIERESHII (Actinobacillus lignieresii) and Actinobacillus PUREURO pneumoniae (Actinobacillus pleuropneumoniae).

[0016] In other modes of the invention in this application, the aforementioned specific kinds are the bacteria of the Mycobacterium (Mycobacterium) group, the Corynebacterium (Corynebacterium) group, an actinomycetes (Actinomycetes), a streptomyces (Streptomyces), Rhodococcus (Rhodococcus), and its close relationship group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 4 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 4 is also offered.

[0017] A probe including the array shown in the array number 4 can be hybridized in 16SrRNA array of Actinomycetes, such as Mycobacterium, Corynebacterium, an actinomycetes group, Streptomyces, and a Rhodococcus group, and the bacteria of the relative. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further all the strains of an Actinomycetes and the bacteria of the relative in a detail for example, : which can carry out the following strains detection and a quantum -- Streptomyces griseus (Streptomyces griseus) -- Streptomyces SARUMONISU (Streptomyces salmonis), Actinomycetes DIN tee Correns (Actinomycetes denticolens), Actinomycetes ODONTORI tee dregs (Actinomycetes odontolyticus), Actinomycetes PIOGENESU (Actinomycetes pyogenes), Leuconostoc MESENTEROIDESU (Leuconostoc mesenteroides), Leuconostoc RAKUTISU (Leuconostoc lactis), Corynebacterium JIFUTERIE (Corynebacterium diphtheriae), Corynebacterium guru TAMIKAMU (Corynebacterium glutamicum), Corynebacterium BOBISU (Corynebacterium bovis), Corynebacterium KUSSHIERI (Corynebacterium kutscheri), [0018] Corynebacterium shoe DOCHUBAKYU low cis- (Corynebacterium pseudotuberculosis), Corynebacterium guru TAMIKAMU (Corynebacterium glutamicum), Corynebacterium RENARU (Corynebacterium renale), Mycobacterium flavescens (Mycobacterium flavescens), Mycobacterium abb SESSASU (Mycobacterium abscessus), Mycobacterium IT ENSU (Mycobacterium aichiense), Mycobacterium avium (Mycobacterium avium), Mycobacterium BOBISU (Mycobacterium bovis), Mycobacterium SERATAMU (Mycobacterium celatum), Mycobacterium CHIERONE (Mycobacterium chelonae), Mycobacterium, and intra -- being cellular (Mycobacterium intracellulare) and [0019] A leprosy bacillus (Mycobacterium leprae), Mycobacterium tuba KYUROSHISU (Mycobacterium tuberculosis), Mycobacterium scrofulaceum (Mycobacterium scrofulaceum), Mycobacterium Town & Country Tamm (Mycobacterium fortuitum), The Mycobacterium vine guy (Mycobacterium szulgai), Mycobacterium gordonaiae (Mycobacterium gordonaiae), Mycobacterium simiae (Mycobacterium simiae) and Mycobacterium non chroma GENIKAMU (Mycobacterium nonchromagenicum).

[0020] In other modes of the invention in this application, the aforementioned specific kinds are a Legionella (Legionella) group and the bacteria of the close relationship group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 5 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 5 is also offered.

[0021] A probe including the array shown in the array number 5 can be hybridized in 16SrRNA array of the bacteria of a Legionella group. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe

which changed Further all the strains of the bacteria of a Legionella group in a detail The following strains For example, detection and :Legionella ANISA (Legionella anisa) which can carry out a quantum, Legionella bull NENSHISU (Legionella brunensis), A Legionella cherry (Legionella cherrii), Legionella ERISURA (Legionella erythra), Legionella FEREI (Legionella feeleii), Legionella HAKERIE (Legionella hakeiae), Legionella James TAUNI en cis- (Legionellajamestownensis), Legionella jaw DANISU (Legionella jordanis), Legionella long BICHIE (Legionella longbeachae), Legionella oak RIJIENSHISU (Legionella oakridgensis), Legionella PARIJI en cis- (Legionella parisiensis), Legionella pneumophila (Legionella pneumophila), and [0022] Legionella RUBURIRU sense (Legionella rubrilucens), Legionella SEINSERENSHI (Legionella sainthelensi), Legionella SANCHIKURUSHISU (Legionella sancticrucis), Legionella SUPIRI ten cis- (Legionella spirensis), Legionella stay GAWARUCHI (Legionella steigerwaltii), and Legionella WAZUWACHI (Legionella wadsworthii).

[0023] In other modes of the invention in this application, it is the bacteria of the close relationship group, and the bacteria of the Pseudomonas (Pseudomonas) group whose aforementioned specific kind is the cause bacillus of septicemia, a Staphylococcus (Staphylococcus) group, and a klebsiella (Klebsiella) group and Escherichia coli (Escherichia coli), and a list are provided with said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 6. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 6 is also offered.

[0024] The Pseudomonas bacteria and Escherichia coli whose probe including the array shown in the array number 6 is the cause bacillus of septicemia, It can hybridize in 16SrRNA array of Staphylococcus group bacteria and the Klebsiella bacteria. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed In a detail, further each strain of the cause bacillus of septicemia For example, :Pseudomonas aeruginosa (Pseudomonasaeruginosa) which can carry out the following strains detection and a quantum, Escherichia coli (Escherichia coli) and Klebsiella pneumoniae (Klebsiella pneumoniae), Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus) and Staphylococcus EPIDAMIDISU (Staphylococcus epidermidis).

[0025] In other modes of the invention in this application the aforementioned specific kind An acetobacter (Acetobacter) group, The Agrobacterium (Agrobacterium) group, a BURADEHIDOBIA MU (Bradyrhizobium) group, The Caulobacter (Caulobacter) group, the Gluconobacter (Gluconobacter) group, They are the bacteria belonging to alpha group of purple nonsulfur bacteria (Proteobacteria), such as a Paracoccus (Paracoccus) group and a rhizobium (Rhizobium) group. And said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 7 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 7 is also offered.

[0026] A probe including the array shown in the array number 7 can be hybridized in 16SrRNA array of the bacteria belonging to alpha group of purple nonsulfur bacteria. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further all the strains of alpha group of purple nonsulfur bacteria in a detail The following strains For example, detection and :acetobacter pass two rear eggplant (Acetobacter pasteurianus) which can carry out a quantum, Acetobacter alder SENII (Acetobacter hansenii), The Agrobacterium ruby (Agrobacterium rubi), Agrobacterium CHUMUFASHIENSU (Agrobacterium tumefaciens), AKUASU pilus ram ITERUSONI (Aquaspirillum itersonii), BURADEHIDOBIA MU ESUPI (Bradyrhizobium sp), Caulobacter ESUPI (Caulobacter sp) and Gluconobacter ASAII (Gluconobacter asaii), And Paracoccus DENITORIFIKANSU (Paracoccus denitrificans) and rhizobium ESUPI (Rhizobium sp).

[0027] In other modes of the invention in this application, the aforementioned specific kinds are the bacteria belonging to beta group of purple nonsulfur bacteria (Proteobacteria), such as an alkali gene (Alcaligenes) group, a BORUDETORA (Bordetella) group, a sphaerotilus (Sphaerotilus) group, and a SUPIRIRAMU (Spirillum) group, and said approach the aforementioned oligonucleotide includes the array of a publication in the array number 8 is offered. Moreover, the probe reagent containing said oligonucleotide used for an oligonucleotide and said approach given in the array number 8 is also offered.

[0028] A probe including the array shown in the array number 8 can be hybridized in 16SrRNA array of the bacteria belonging to beta group of purple nonsulfur bacteria. Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Further each strain of beta group of purple nonsulfur bacteria in a detail The following strains For example, detection, :alkali gene DENITORIFIKANSU which can carry out a quantum (Alcaligenes denitrificans), Alkali gene FAEKARISU (Alcaligenes faecalis), Alkali gene ESUPI (Alcaligenes sp) and BORUDETORA ABIUMU (Bordetella avium), BORUDETORA BURONKISEPUTIKA (Bordetella bronchiseptica), BORUDETORA PARAPE Ruta cis- (Bordetella parapertussis), SUPIRIRAMU BORUTANSU (Spirillum volutans), Sphaerotilus NATANSU (Sphaerotilus natans), SUTERERA WAZUWASENSHISU (Sutterella wadsworthensis) and tie RORERA EKUIJENITARISU (Taylorella equigenitalis).

[0029] As a probe concerning the invention in this application, a TaqMan probe compoundable in PE Biotechnology Systems Japan is desirable. a TaqMan probe -- 5' side -- reporter coloring matter and 3' -- quencher coloring matter is attached to the side. In the condition of having not hybridized, the luminous energy absorbed with reporter coloring matter is emitted as fluorescence with quencher coloring matter. If PCR progresses after the above-mentioned probe has hybridized to DNA, a probe will decompose with the exonuclease activity which DNA polymerase has, energy will stop transmitting from reporter coloring matter to quencher coloring matter, and reporter coloring matter will come to emit fluorescence. Thus, by hybridization, since fluorescence wavelength changes, the quantum of the above-mentioned probe, DNA to hybridize, and the bacillus which includes Above DNA further becomes possible by carrying out monitoring of the fluorescence wavelength which changed.

[0030] Moreover, although the oligonucleotide which has the array shown in the array numbers 1-8 as a probe concerning the invention in this application is desirable, it can be the probe which added some nucleotides to the upstream or the downstream of an array [**** / lacking a part of the array]. Although it does not specify, it is usually necessary to make especially the thermal denaturation temperature (for it to abbreviate to Tm value hereafter) of a probe higher about 4 degrees C or more than Tm of a primer. Preferably, a probe with Tm value high about 10 degrees C can be used from about 4 degrees C rather than Tm of a primer. Moreover, in case a TaqMan probe is produced, it is necessary to make the five prime end of a probe into nucleotides other than G. Furthermore, the thing of C in a probe made comparatively higher than the rate of G is desirable. The die length of a probe is 30mer(s) further again. It is desirable that it is the following.

[0031] The primer which designs a bacillus using this probe in case a quantum is carried out, detection and can have a sense side designed 104th in between [the 69th to], and an antisense side can be designed 226th in between [the 162nd to] preferably 250th in between [the 128th to] 104th in between [the 1st to] (numbering of an Escherichia coli 16SrRNA array). As mentioned above, as for Tm value of a primer, it is more desirable than Tm value of a probe to make it low and to make it desirable Tm value low about 10 degrees C from about 4 degrees C about 4 degrees C or more. Moreover, in order to prevent designing a primer and formation of a primer dimer so that higher order structure may not be formed, it is desirable to make it the three-dash terminals of a primer not become a complementary array.

[0032]

[Example] Although the invention in this application is explained in more detail in the following examples, the range of the invention in this application is not limited to these.

[0033] The 500g sawdust and the 50g cow dung compost were mixed with dog food with example 1 dry weight of 1kg, and water was supplied so that water content might become 60%. the sample is supplied in an organic waste cracking unit -- aeration was carried out on condition that 1.2 L/min and DM, and decomposition processing of the dog food was carried out. Temperature control is carried out so that the wall temperature of a processing container may become always lower 1 degree C than sample temperature, The fermentation heat produced by decomposition was used. At the decomposition processing process of dog food, it is CO₂. Three peaks were in the generating rate. The 1st peak was [the 3rd peak of the 2nd peak] 24 hours after 17 hours after 13 hours after. Then, it sampled at each peak period and analyzed about the bacterial flora of each sample with modifier concentration gradient gel electrophoresis (it abbreviates to the following and DGGE). Consequently, :bacillus subtilis (Bacillus subtilis) and Bacillus licheniformis (Bacillus licheniformis) that the following microbial groups are working preferentially turned out to be, bacillus thermostat DENITORIFIKANSU (Bacillus thermodenitrificans), bacillus (Bacillus) A10 share, bacillus (Bacillus) A14 share, and bacillus (Bacillus) S1 share. Bacillus (Bacillus) A10 share is bacillus thermostat DENITORIFIKANSU (Bacillus thermodenitrificans). Bacillus cull doxyl cage TIKYU (Bacillus caldoxylolyticu) A close relationship kind, Bacillus (Bacillus) A14 share is bacillus HAROJU lance (Bacillus halodurans) YABACHIRUSU thermostat clo AKA (Bacillus thermocloacae). A close relationship kind, The bacillus (Bacillus) S1 share was considered to be a close relationship kind by bacillus sir MOS FAERIKASU (Bacillus thermosphaericus).

[0034] When VI-V2 field of each 16SrRNA array of the above-mentioned bacillus was analyzed, it had in common the same array as what is shown in the array number 1. Then, based on the array of the fluctuation field in the upstream and the downstream of the array number 1, the primer set of each bacillus was designed as follows.

Bacillus subtilis (Bacillus subtilis) (magnification chain length; 85bp (array number 21))

5'-AGCGGACAGATGGGAGCTT-3' (array number 9)

5'-TTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT-3' (array number 10)

Bacillus licheniformis (Bacillus licheniformis) (magnification chain length; 69bp (array number 22))

[0035] 5'-CTTGCTCCCTTAGGTCA-3' (array number 11)

5'-TTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTT-3' (array number 12)

Bacillus thermostat dent RIFIKANSU (Bacillus thermodenitrificans) (magnification chain length; 63bp (array number 23))

5'-AGCTTGCTCTGTTGGTCA-3' (array number 13)

5'-CTTGCAGGCAGGTTGC-3' (array number 14)

[0036] Bacillus (Bacillus) A10 share (magnification chain length; 65bp (array number 24))

5'-CTTGCTTCTGTTCGGTTAGCG -- 3' (array number 15)

5'-CCGGTCTTACGGGCAGG-3' (array number 16)

Bacillus (Bacillus) A14 share (magnification chain length; 67bp (array number 25))

5'-GCTCGCTCTCTTCAGTCAG-3' (array number 17)

5'-GCGAGTTATCCCGGTCTTACAG-3' (array number 18)

Bacillus (Bacillus) S1 share (magnification chain length; 147bp (array number 26))

5'-GTTGCTTTATGAGGTTAGC-3' (array number 19)

5'-GGTAGCAGAACACCTTCAACA-3' (array number 20)

[0037] PCR was performed by using as mold the genome extracted from the garbage disposal sample using the primer set of each above-mentioned bacillus. In PCR, the cycle which consists of the thermal denaturation process held for 30 seconds at 94 degrees C, a primer joint process held for 30 seconds at 58 degrees C, and an expanding process held for 1 minute at 72 degrees C was repeated 30 times. The presentation of an PCR solution is shown in the following table 1.

[0038]

[Table 1]

各菌のプライマーセット	0.3 μM × 2
dATP	200 μM
dGTP	200 μM
dCTP	200 μM
dTTP	200 μM
KCl	50mM
Tris-HCl (pH8.3)	10mM
MgCl ₂	2.0mM
Taq DNA ポリメラーゼ	0.025U / μL
サンプル	1 μL / 50 μL

[0039] The DNA fragment of each bacillus origin was able to be obtained by PCR. The base sequence of the DNA fragment amplified using the primer set of bacillus subtilis (Bacillus subtilis) for the array number 21 Bacillus licheniformis (Bacillus licheniformis) The base sequence of the DNA fragment amplified using the primer set for the array number 22 Bacillus thermostat dent RIFIKANSU (Bacillus thermodenitrificans) The base sequence of the DNA fragment amplified using the primer set for the array number 23 The base sequence of the DNA fragment amplified using the bacillus (Bacillus) A10 share primer set for the array number 24 The base sequence of the DNA fragment which used the bacillus (Bacillus) S1 share primer set for the array number 25, and was amplified in the base sequence of the DNA fragment amplified using the bacillus (Bacillus) A14 share primer set is shown in the array number 26. The DNA fragment of each obtained bacillus origin is made into Criterion DNA, and it is 1x105. A copy number /μL, and 2x105 A copy number /μL, and 5x105 A copy number /μL, and 1x106 Dilution preparation of each DNA fragment was carried out so that it

might be set to a copy number / muL.

[0040] The TaqMan oligonucleotide probe (what embellished the Fam reporter in the five prime end, and embellished the Tamara quencher in the three-dash terminal) of the array shown in the array number 1 was produced. TaqMan which 200microM Contains every 900microM and a TaqMan probe for a primer and which carried out two fold serial dilution Universal PCR Master Quantitive PCR was performed about each bacillus using Mix (made in PE biotechnology systems Japan). It sets to quantitative PCR and is 40 cycle ***** about 95-degree-C thermal denaturation for 15 seconds, and primer association / expanding reaction for 60-degree-C 1 minute. As detection and a measuring instrument, it is GeneAmp. 5700 (made in PE biotechnology systems Japan) was used.

[0041] It asked for the number of each bacilli in each sample by dividing the number of fragments of 16SrRNA array of each analyzed bacillus by 7. The quantum data of each bacillus in each sample are shown in the following table 2. the number of microorganism shown in Table 2 -- sample 100mg -- it is an inner value.

[Table 2]

配列番号 1 に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた

定量的PCR による各種バチルス属菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

	Bacillus subtilis	Bacillus licheniformis	Bacillus thermodenitrificans	Bacillus A10株	Bacillus A14株	Bacillus S1株
サンプル 1 (13hr)	4.02×10^8	7.70×10^8	1.28×10^8	3.98×10^3	8.66×10^1	1.25×10^1
サンプル 2 (17hr)	1.08×10^8	5.19×10^8	1.24×10^8	2.89×10^4	4.07×10^3	3.52×10^3
サンプル 3 (24hr)	1.70×10^8	8.48×10^8	1.92×10^8	7.27×10^7	3.68×10^7	1.19×10^7

[0042] Thus, it became quickly possible detection and to carry out a quantum about each strain of Bacillus which works in a garbage disposal process by using the TaqMan probe of the array shown in the array number 1.

[0043] The 500g sawdust and the 50g cow dung compost were mixed with 1kg of organic wastes which use example 2 starch as a principal component, and water was supplied so that water content might become 60%. The sample was supplied in the organic waste cracking unit, aeration was carried out on condition that 1.2 L/min and DM, and decomposition processing was carried out. Sample temperature was kept at 50 degrees C. It sampled by three points of the 72nd hour and the 96th hour after decomposition processing initiation for the 24th hour, and analyzed with strange pharmaceutical preparation concentration gradient gel electrophoresis (DGGE) about the bacterial flora of each sample. Consequently, it turned out that the bacteria of the following belonging to beta group of purple nonsulfur bacteria are working. Alkali gene (Alcaligenes) S6 share, a BORUDETORA (Bordetella) S9 stock.

[0044] When V1-V2 field of each 16SrRNA array of the above-mentioned bacillus was analyzed, it had in common the same array as what is shown in the array number 8. Then, based on the array of the fluctuation field in the upstream and the downstream of the array number 8, the primer set of each bacillus was designed as follows.

Alkali gene (Alcaligenes) S6 share (magnification chain length; 142bp (array number 27))

5'-AGCGCGAGGTAAAGCTTGCT-3' (array number 29)

5'-TGCAGATCCCCCTTT-3' (array number 30)

Nine shares (magnification chain length; 135bp (array number 28)) of BordetellaS(s)

5'-TTCGGCCTGGCGGC-3' (array number 31)

5'-AGAGGTCCCGAAGGATCCC-3' (array number 32)

[0045] PCR was performed by using as mold the genome extracted from the garbage disposal sample using the primer set of each above-mentioned bacillus. In PCR, the cycle which consists of the thermal denaturation process held for 30 seconds at 94 degrees C, a primer joint process held for 30 seconds at 58 degrees C, and an expanding process held for 1 minute at 72 degrees C was repeated 30 times. The presentation of an PCR solution was the same as what was shown in Table 1.

[0046] The DNA fragment of each bacillus origin was able to be obtained by PCR. an alkali gene (Alcaligenes) -- the base sequence of the DNA fragment which used the primer set of a BORUDETORA (Bordetella) S9 stock for the array number 27, and was amplified in the base sequence of the DNA fragment amplified using the S6 share primer set is shown in the array number 28. The DNA fragment of each obtained bacillus origin is made into Criterion DNA, and it is 1×10^5 . A copy number /muL, and 2×10^5 A copy number /muL, and 5×10^5 Dilution preparation of each DNA fragment was carried out so that it might be set to a copy number /muL, and 1×10^6 copy number / muL.

[0047] The TaqMan oligonucleotide probe (what embellished the Fam reporter in the five prime end, and embellished the Tamara quencher in the three-dash terminal) of the array shown in the array number 8 was produced. TaqMan which 200microM Contains every 900microM and a TaqMan probe for a primer and which carried out two fold serial dilution Universal PCR Master Quantitive PCR was performed about each bacillus using Mix (made in PE biotechnology systems Japan). It sets to quantitative PCR and is 40 cycle ***** about 95-degree-C thermal denaturation for 15 seconds, and primer association / expanding reaction for 60-degree-C 1 minute. In detection and a measuring instrument, it is GeneAmp. 5700 (made in PE biotechnology systems Japan) was used.

[0048] It asked for the number of each bacilli in each sample by dividing the number of fragments of 16SrRNA array of each analyzed bacillus by 7. The quantum data of each bacillus in each sample are shown in the following table 3. the number of microorganism shown in Table 3 -- sample 100mg -- it is an inner value.

[Table 3]

配列番号 8 に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた定量的PCRによる菌の検出・定量
(菌数／サンプル100mg)

	Alcaligenes S6株	Bordetella S9株
サンプル 1 (24hr)	3.52×10^4	8.04×10^4
サンプル 2 (72hr)	1.80×10^5	2.24×10^5
サンプル 3 (96hr)	1.73×10^5	2.05×10^5

[0049] Thus, it became quickly possible detection and to carry out a quantum about each strain belonging to beta group of purple nonsulfur bacteria who works in an organic waste processing process by using the TaqMan probe of the array shown in the array number 8.

[0050]

[Effect of the Invention] The invention in this application counts 16SrRNA(s) of Escherichia coli from the sense side of DNA which carries out a code. The probe which added the fluorochrome to the oligonucleotide including the DNA array which carries out the code of the 16SrRNA(s) of the eubacterium equivalent to the 104th to the 126th array (5'-GGCGGACGGGTGAGTAATGTCTG-3'), or its complementary sequence, Perform PCR using the primer designed based on the array of the fluctuation field which exists in the upstream and the downstream of the above-mentioned probe, and by measuring fluorescence intensity in the fluorescence wavelength of the probe which changed Detection and the approach of carrying out a quantum are offered only for the specific kind in various eubacterium groups. By using the probe of the invention in this application, it becomes quickly possible about all the strains in an eubacterium detection and to carry out a quantum. Moreover, in the detection and the quantum approach concerning the invention in this application, by using a nonspecific probe between eubacteia, since a common probe can be used on the occasion of detection of alpha group of Bacillus, legionella bacteria, an Actinomyces, a ***** cause bacillus, and purple nonsulfur bacteria, beta group of purple nonsulfur bacteria, etc., it is economical.

[Layout Table]

<110> Denso Co., Ltd. <120> A method for identifying-and-quantitatively-determining eubacteria<130> ND 1004228<160> 32<210> 1<211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 1 cacgtgttac-tacccgtcc-gcc 23<210> 2 <211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 2 tacgtgttac tcacccgtcc gcc 23 <210> 3 <211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 3 caagcattac tcacccgtcc gcc 23 <210> 4 <211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 4 cacgtgttac tcacccgttc gcc 23 <210> 5<211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 5 tacgcgttac tcamccgttc grc23 <210> 6 <211> 25<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 6 asyrrtaact caccgtccg ccrc 25 <210> 7 <211> 25<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 7 acgygttaact caccgtccy ccrc 25 <210> 8 <211> 25<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 8 atrywttact caccgttcg ccact 25 <210> 9 <211> 19<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 9 agcggacaga tgggagctt 19 <210> 10 <211> 24<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 10 ttatcccagt ttacaggca ggtt 24 <210> 11 <211> 20<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 11 ctgtccct taggtcagcc 20 <210> 12 <211> 24<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 12 ttatcccagt ttacaggca ggtt 24 <210> 13 <211> 21<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 13 agctgtct tttttttttt 21 <210> 14 <211> 16<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 14ttgcggccgca ggttgc 16 <210> 15 <211> 21<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 15 ctgcgtttagc g 21 <210> 16 <211> 17<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 16ccgtttagc gggcagg 17 <210> 17 <211> 21<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 17 gtcgcgttcc ttccatgtca g 21 <210> 18 <211> 22<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 18 gcgagttac ccgggtttac ag 22 <210> 19<211> 2 2<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 19gcttgcgtttt tatgaggta-gc 22<210> 20<211> 23<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 20ggtagcagaa ccacccatca-aca 23<210> 21 <211> 85<212> DNA <213> Bacillus subtilis <400> 21 agcggacaga tgggagctt cccctgtat ttagccggcg acgggtgatg aacacgtggg 60 taacctgcctt gtaagactgg gataas 85 <210> 22 <211> 69<212> DNA <213> Bacillus licheniformis <400> 22 ctgcgtccct taggtcagcc gccggacgggt gatgtacacg tggtaacct gcctgtaa 60ctggatata 69 <210> 23 <211> 63<212> DNA <213> Bacillus thermodenitrificans <400> 23 agctgtct tttttttttt 21 <210> 16 <211> 17<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 16ccgtttagc gggcagg 17 <210> 17 <211> 21<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 17 gtcgcgttcc ttccatgtca gggccggccg ggtgagtaac acgtgggtaa cttgcgttca 60agaccgg 67 <210> 26<211> 147 <212> DNA <213> Bacillus S1 <400> 26gcttgcgtttt tatgaggta gcccggccg ggtgagtaac acgtgggtaa cttgcgttca 60 agaccggat aactcgccga aacgcgtgt aataccggat aacacagccg agcgcgttca 120 cccgtgttca aagggtttt tgcattac 147 <210> 27 <211> 142<212> DNA <213> Alcaligenes S6 <400> 27agcgcgttca aagggtttt accttgcggc cgagtggcga acgggtgatg aatgtatcg 60aacgtgcctt gtagccggggg ataactactc gaaagagtgg ctaataccgc atacgcgttca 120cgggggaaag gggggatcg ca 147 <210> 28 <211> 135<212> DNA <213> Bordetella S9 <400> 28 ttccgcctgg cggcgagtgg cgaacgggtt agtaatgcgtt cggaaacgtgc ccagttgtgg 60 gggataacca cggaaacgtgc tggtaatacc cgtatccggc cttagggggaa aaggggggga 120ttccgcctgg cctct 135 <210> 29 <211> 19<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 29 agcgcgttca aagggtttt 19 <210> 30 <211> 16<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 30tgcgttccccc ccctt 16 <210> 31 <211> 14<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 31ttccgcctgg cggc 14 <210> 32 <211> 19<212> DNA <213> Artificial Sequence <400> 32 agaggcccg aaggatccc 19

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-51783

(P2002-51783A)

(43) 公開日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

(51) Int.Cl. ¹	識別記号	F I	テーマコード ² (参考)
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 Q 1/68	A 2 G 0 4 5
C 12 Q 1/68		G 01 N 21/78	C 2 G 0 5 4
G 01 N 21/78		33/53	M 4 B 0 2 4
33/53		33/566	4 B 0 6 3
33/566		33/569	F

審査請求 未請求 請求項の数25 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-241500(P2000-241500)

(71) 出願人 000004260

株式会社デンソー

愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地

(22) 出願日 平成12年8月9日 (2000.8.9)

(72) 発明者 福田 裕章

愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会
社デンソー内

(72) 発明者 岡本 泰志

愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会
社デンソー内

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真正細菌の検出・定量法

(57) 【要約】

【課題】 真正細菌に属する全ての菌種を迅速に検出・
定量する方法の提供。

【解決手段】 各種真正細菌群の中の特異的な種のみを
検出・定量する方法であって、以下のステップ：(1)
大腸菌 (Escherichia coli) の 16 S
rRNA をコードする DNA 配列のナンパリングにおい
て、真正細菌の 16 S rRNA をコードする DNA 配列
のセンス側から数えて 104 番目から 126 番目の配列
又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色
素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下
流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したブライ
マーとを用いたポリメラーゼチェインリアクション；及
び(2) 変化したプローブの蛍光波長における蛍光強度
の測定；を含む前記方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法であって、以下のステップ：(1) 大腸菌 (*Escherichia coli*) の 16 S r RNA をコードする DNA 配列のナンバリングにおいて、真正細菌の 16 S r RNA をコードする DNA のセンス側から数えて 104 番目から 126 番目の配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いたポリメラーゼチェインリアクション；及び (2) 変化したプローブの蛍光波長における蛍光強度の測定；を含む前記方法。

【請求項2】 前記の特異的な種が、バチルス (*Bacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号1に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2に記載の方法に用いられる、請求項3に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項5】 前記の特異的な種が、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号2に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 請求項5に記載の方法に用いられる、請求項6に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項8】 前記の特異的な種が、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号3に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 請求項8に記載の方法に用いられる、請求項9に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項11】 前記の特異的な種が、ミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノマイセス (*Actinomycetes*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号4に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項12】 配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項13】 請求項11に記載の方法に用いられる、請求項12に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項14】 前記の特異的な種が、レジオネラ (*Legionella*) 属及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号5に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項15】 配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項16】 請求項14に記載の方法に用いられる、請求項15に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【請求項17】 前記の特異的な種が、敗血症の原因菌である、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属の細菌及び大腸菌 (*Escherichia coli*) 並びにその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号6に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項18】 配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項19】 請求項17に記載の方法に用いられる、請求項18に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

30

【請求項20】 前記の特異的な種が、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、ブラデヒドビウム (*Bradyrhizobium*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、グルコノバクター (*Glucoronobacter*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の α グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号7に記載の配列を含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項21】 配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項22】 請求項20に記載の方法に用いられる、請求項21に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

50

【請求項23】 前記の特異的な種が、アルカリジーン (*Alcaligenes*) 属、ボルデトラ (*Bordetella*) 属、スファエロテイルス (*Sphaerotilus*) 属、スピリラム (*Spirillum*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の β グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号8に記載の配列を含む、請

求項1に記載の方法。

【請求項24】 配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項25】 請求項23に記載の方法に用いられる、請求項23に記載のオリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本願発明は、ポリメラーゼチャイエンリアクション（以下、PCRと略す）による各種真正細菌を検出・定量する方法、及び当該方法に用いるプローブに関する。各種の微生物の検出・定量は、医学の領域をはじめ他の分野において行なわれている。結核や敗血症などの感染症を引き起こす細菌の検出・定量は特に重要である。本発明は、感染症を引き起こす細菌類を含む各種真正細菌の検出・定量のためのプローブ、及び当該プローブを用いた検出・定量方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細菌類の検出・同定には、一般に、選択培地による分離や増殖培地による増殖、顕微鏡観察や免疫学的な反応性を利用した方法など様々なものが用いられている。これらの検出・同定方法の操作は多大な時間と熟練を必要とする。化学的な性状をもとに菌種を特定するキットの開発により熟練の必要性は低下したが、培養に時間を要する問題は未だ解決されていない。

【0003】近年、各種細菌の遺伝子を標的として当該菌を検出・同定する技術が開発された。かかる技術により、菌の検出・同定において大幅な時間短縮が可能となっている。このような遺伝子の例は、特許第2552787号や特公平5-78319号、特開平8-297号、特開平10-191982中に記載されている16Sリボソーマル遺伝子（以下、16S rRNA配列と略す）や、特許第2540023号中に記載されている、菌に特異的な熱ショック蛋白質である。

【0004】特許第2540023号は、マイコバクテリウム属を検出するプライマーを提供しているが、その種類も多く、また定量解析ができない。特許第2552787号では、マイコバクテリウム属細菌に特異的なプライマーを用いて増幅断片を調製し、制限酵素処理と、プローブのハイブリダイズとの併用により結核菌群のみを検出する方法である。この方法は、結核菌群の検出を可能にするが、定量性がなく、不十分な情報しか提供できない。特開平10-191982号は、レジオネラ菌に特異的なプローブ（塩基配列871-890、大腸菌16S rRNA配列のナンパリング）により、レジオネラ菌を検出する方法を開示している。この方法ではレジオネラ菌をハイブリダイゼーションにより検出することができるが、バックグラウンドの影響を受けやすいため感度が低い。特開平8-297号は、真正細菌に特徴的な

核酸標的配列をPCRや鎖置換増幅（SDA）で検出するためのオリゴヌクレオチドプライマーを開示しているが、この方法では、種特異的な検出をおこなうことはできない。以上のように、特定の菌や真正細菌などを検出する様々な技術が確立されてきているものの、これらの技術のいずれも、特定の菌を迅速に定量することはできない。さらに、特定の菌を定量する際に、菌特異的なプローブを用いることがあるが、このような菌特異的なプローブは、その特異性の故に汎用性がないため、多種の菌を定量するためには多種のプローブが必要になるという問題がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本願発明の課題は、真正細菌に属する全ての菌種を迅速に検出・定量する技術を確立することであり、特に、それに基づき菌種特異的プライマーを設計することができる変動領域に挾まれた、菌種間で比較的保存性の高い領域内で、当該菌種間で汎用性の高いプローブを設計することである。そして、菌種毎に特異的なプライマーと本願発明に係る汎用性の高いプローブを用いて定量的PCRをおこなうことにより特定の菌の検出・定量を迅速におこなうことも、本発明の課題である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明は、各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法であって、以下のステップ：（1）大腸菌（Escherichia coli）の16S rRNAをコードするDNA配列のナンパリングにおいて、真正細菌の16S rRNAをコードするDNA配列のセンス側から数えて104番目から126番目の配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を附加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いたポリメラーゼチャイエンリアクション；及び（2）変化したプローブの蛍光波長における蛍光強度の測定；を含む前記方法を提供する。

【0007】本願発明の1の態様においては、前記の特異的な種が、バチルス（Bacillus）属、スタフィロコッカス（Staphylococcus）属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号1に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号1に記載のオリゴヌクレオチド、及び前記方法に用いられる、前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0008】配列番号1に示す配列を含むプローブは、バチルス属やスタフィロコッカス属の細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定すること

により、バチルス属およびスタフィロコッカス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alcalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・バジウス (*Bacillus badius*)、バチルス・カルドリティカス (*Bacillus caldolyticus*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・コーニイ (*Bacillus cohnii*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・インソリタス (*Bacillus insolitus*)、バチルス・カウストフィラス (*Bacillus kaustophilus*)、バチルス・レンタス (*Bacillus lentinus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、

【0009】バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・メチノリカス (*Bacillus methenolicus*)、バチルス・パリダス (*Bacillus pallidus*)、バチルス・ポピリエ (*Bacillus popilliae*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・スミチイ (*Bacillus smithii*)、バチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・サーモアミロボランス (*Bacillus thermoamylorans*)、バチルス・サーモデントリフィカンス (*Bacillus thermodenitrificans*)、バチルス・サーモグルコシダシウス (*Bacillus thermogluconidasius*)、バチルス・サーモレオボランス (*Bacillus thermoleovorans*)、バチルス・ベデリ (*Bacillus vedderi*)、カロラマター・ファービダス (*Calamator fervidus*)、

【0010】クロストリジウム・ファービダス (*Clostridium fervidus*)、クルシア・ギブソニイ (*Kurthia gibsonii*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、サッカロコッカス・サーモフィラス (*Saccharococcus thermophilus*)、サルシナ・ベントリキュリ (*Sarcina ventriculi*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・エピダーミディス (*Staphylococcus epidermidis*)、及びスタフィロコッカス・ホミニス (*Staphylococcus hominis*)。

【0011】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、ブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号2に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号2に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0012】配列番号2に示す配列を含むプローブは、ブレビバチルス属やパエニバチルス属などの細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列

に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、ブレビバチルス属やパエニバチルス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：ブレビバチルス・アグリ (*Brevibacillus agri*)、ブレビバチルス・ボルステレンシス (*Brevibacillus borstelensis*)、ブレビバチルス・ブレビス (*Brevibacillus brevis*)、ブレビバチルス・セントロスピラス (*Brevibacillus centrosporus*)、ブレビバチルス・コシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*)、ブレビバチルス・フォルモサス (*Brevibacillus formosus*)、ブレビバチルス・ラチロスピラス (*Brevibacillus laterosporus*)、ブレビバチルス・パラブリス (*Brevibacillus parabrevis*)、

【0013】ブレビバチルス・レウスゼリ (*Brevibacillus reuszeri*)、ブレビバチルス・サーモルバー (*Brevibacillus thermoruber*)、パエニバチルス・アヒベンシス (*Paenibacillus ahbensis*)、パエニバチルス・アルベイ (*Paenibacillus alvei*)、パエニバチルス・アミロリティカス (*Paenibacillus amyloolyticus*)、パエニバチルス・アピアリウス (*Paenibacillus aparius*)、パエニバチルス・アゾトフィクサンス (*Paenibacillus azotofixans*)、パエニバチルス・コンドロイチナス (*Paenibacillus chondroitinus*)、パエニバチルス・カードラノリティカス (*Paenibacillus curdlanolyticus*)、パエニバチルス・デエラム (*Paenibacillus durum*)、パエニバチルス・グルカノリティカス (*Paenibacillus glucanolyticus*)、パエニバチルス・イリノイセンシス (*Paenibacillus illinoiensis*)、パエニバチルス・コベンシス (*Paenibacillus kobensis*)、パエニバチルス・ラルバエ (*Paenibacillus larvae*)、パエニバチルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、パエニバチルス・マクアリエンシス (*Paenibacillus macquariensis*)、パエニバチルス・パブリ (*Paenibacillus pabuli*)、パエニバチルス・ペオリエ (*Paenibacillus peoriae*)、パエニバチルス・ポリミクサ (*Paenibacillus polymyxa*)、パエニバチルス・チアミノリティカス (*Paenibacillus thiaminolyticus*)、及びパエニバチルス・バリダス (*Paenibacillus validus*)。

【0014】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アクチノバチルス (*Actinobacillus*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号3に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号3に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0015】配列番号3に示す配列を含むプローブは、アクチノバチルス属などの細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計した

プライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、アクチノバチルス属の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アクチノバチルス・カプスラタス (*Actinobacillus capsulatus*)、アクチノバチルス・エクーリ (*Actinobacillus equuli*)、アクチノバチルス・ホミニス (*Actinobacillus hominis*)、アクチノバチルス・インドリカス (*Actinobacillus indolicus*)、アクチノバチルス・リグニエレシイ (*Actinobacillus lignieresii*)、及びアクチノバチルス・プレウロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)。

【0016】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、ミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノマイセス (*Actinomyces*)、ストレプトマイセス (*Streptomyces*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号4に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号4に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる、前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0017】配列番号4に示す配列を含むプローブは、ミコバクテリウム属およびコリネバクテリウム属およびアクチノマイセス属およびストレプトマイセス属およびロドコッカス属などの放線菌およびその類縁の細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、放線菌およびその類縁の細菌の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・サルモニス (*Streptomyces salmonis*)、アクチノマイセス・デンティコレンス (*Actinomyces denticolens*)、アクチノマイセス・オドントリティカス (*Actinomyces odontolyticus*)、アクチノマイセス・ピオゲネス (*Actinomyces pyogenes*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ロイコノストック・ラクティス (*Leuconostoc lactis*)、コリネバクテリウム・ジフテリエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・ボビス (*Corynebacterium bovis*)、コリネバクテリウム・クッシェリ (*Corynebacterium kutscheri*)、【0018】コリネバクテリウム・シードチューバーキュローシス (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacteri*

10 *um glutamicum*)、コリネバクテリウム・レナール (*Corynebacterium renale*)、マイコバクテリウム・フラベッセンス (*Mycobacterium flavescens*)、マイコバクテリウム・アブセッサス (*Mycobacterium abscessus*)、マイコバクテリウム・アイチエンス (*Mycobacterium aichiense*)、マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム・セラタム (*Mycobacterium celatum*)、マイコバクテリウム・チェロネ (*Mycobacterium chelonae*)、マイコバクテリウム・イントラセルラー (*Mycobacterium intracellulare*)、

【0019】マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*)、マイコバクテリウム・チューバーキュローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリウム・フォルチタム (*Mycobacterium fortitum*)、マイコバクテリウム・ツルガイ (*Mycobacterium szulgai*)、マイコバクテリウム・ゴルドネ (*Mycobacterium gordonaiae*)、マイコバクテリウム・シミエ (*Mycobacterium simiae*)、及びマイコバクテリウム・ノンクロマゲニカム (*Mycobacterium nonchromogenicum*)。

【0020】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、レジオネラ (*Legionella*) 属、及びその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号5に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号5に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

30 【0021】配列番号5に示す配列を含むプローブは、レジオネラ属の細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、レジオネラ属の細菌の全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：レジオネラ・アニサ (*Legionella anisa*)、レジオネラ・ブルネンシス (*Legionella brunensis*)、レジオネラ・チェリイ (*Legionella cherrii*)、レジオネラ・エリスラ (*Legionella erythra*)、レジオネラ・フェーレイ (*Legionella feeleii*)、レジオネラ・ハケリエ (*Legionella hackeliae*)、レジオネラ・ジャメスタウニエンシス (*Legionella jamaicensis*)、レジオネラ・ジョーダニス (*Legionella jordanis*)、レジオネラ・ロングビーチエ (*Legionella longbeachae*)、レジオネラ・オークリジエンシス (*Legionella oakridgensis*)、レジオネラ・パリジエンシス (*Legionella parisiensis*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、

40 【0022】レジオネラ・ルブリルセンス (*Legionella*

rubrilucens)、レジオネラ・セインセレンシ (*Legionella sainthelensi*)、レジオネラ・サンチクルシス (*Legionella sancticrucis*)、レジオネラ・スピリテンシス (*Legionella spiritensis*)、レジオネラ・ステイガワルチ (*Legionella steigerwaltii*)、及びレジオネラ・ワズワーチ (*Legionella wadsworthii*)。

【0023】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、敗血症の原因菌である、ショードモナス (*Pseudomonas*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、及びクレブシエラ (*Klebsiella*) 属の細菌、及び大腸菌 (*Escherichia coli*)、並びにその近縁属の細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号6に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号6に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0024】配列番号6に示す配列を含むプローブは、敗血症の原因菌である、ショードモナス属細菌および大腸菌、スタフィロコッカス属細菌、クレブシエラ属細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、敗血症の原因菌の各菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：ショードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、及びスタフィロコッカス・エピダーミディス (*Staphylococcus epidermidis*)。

【0025】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、ブラデヒドビウム (*Bradyrhizobium*) 属、カウロバクター (*Caulobacter*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の α グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号7に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号7に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0026】配列番号7に示す配列を含むプローブは、紅色非硫黄細菌の α グループに属する細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき

き設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、紅色非硫黄細菌の α グループの全菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アセトバクター・パストーリアナス (*Acetobacter pasteurianus*)、アセトバクター・ハンセンii (*Acetobacter hansenii*)、アグロバクテリウム・ルビ (*Agrobacterium rubi*)、アグロバクテリウム・チュームファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、アクアスピリラム・イテルソニ (*Aquaspirillum itersonii*)、ブラデヒドビウム・エスピー (*Bradyrhizobium sp*)、カウロバクター・エスピー (*Caulobacter sp*)、グルコノバクター・アサイ (*Gluconobacter asaii*)、及びパラコッカス・デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans*)、及びリゾビウム・エスピー (*Rhizobium sp*)。

【0027】本願発明の他の態様においては、前記の特異的な種が、アルカリジーン (*Alcaligenes*) 属、ボルデトラ (*Bordetella*) 属、スマエロティルス (*Sphaerotilus*) 属、スピリラム (*Spirillum*) 属などの紅色非硫黄細菌 (*Proteobacteria*) の β グループに属する細菌であり、かつ、前記のオリゴヌクレオチドが配列番号8に記載の配列を含む、前記方法が提供される。また、配列番号8に記載のオリゴヌクレオチド及び前記方法に用いられる前記オリゴヌクレオチドを含むプローブ試薬も提供される。

【0028】配列番号8に示す配列を含むプローブは、紅色非硫黄細菌の β グループに属する細菌の16S rRNA配列にハイブリダイズすることができ、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーを用いてPCRを行ない、変化したプローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することで、紅色非硫黄細菌の β グループの各菌種を、更に詳細には、例えば次のような菌種を検出・定量することができる：アルカリジーン・デニトリフィカンス (*Alcaligenes denitrificans*)、アルカリジーン・ファエカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルカリジーン・エスピー (*Alcaligenes sp*)、ボルデトラ・アビウム (*Bordetella avium*)、ボルデトラ・ブロンキセプティカ (*Bordetella bronchiseptica*)、ボルデトラ・パラペルタシス (*Bordetella parapertussis*)、スピリラム・ボルタンス (*Spirillum volutans*)、スマエロティルス・ナタヌス (*Sphaerotilus natans*)、ステレラ・ワズワーセンシス (*Sutterella wadsworthensis*)、及びタイロレラ・エクイジエニタリス (*Taylorella equigenitalis*)。

【0029】本願発明に係るプローブとしては、(株)PEバイオシステムズジャパンで合成可能なTaqManプローブが好ましい。TaqManプローブには、5'側にレポーター色素と3'側にクエンチャーカラム色素が付いている。ハイブリダイズしていない状態では、レボ

ーター色素により吸収した光のエネルギーはクエンチャー色素により蛍光として放出される。上記プローブがDNAにハイブリダイズした状態でPCRが進むと、DNAポリメラーゼの持つエキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解し、レポーター色素からクエンチャー色素へエネルギーが伝わらなくなり、レポーター色素が蛍光を発するようになる。このようにハイブリダイゼーションにより、蛍光波長が変化するため、変化した蛍光波長をモニタリングすることで、上記プローブとハイブリダイズするDNA、さらには上記DNAを含む菌の定量が可能になる。

【0030】また、本願発明に係るプローブとしては、配列番号1～8に示す配列をもつオリゴヌクレオチドが望ましいが、その配列の一部を欠いたり、又は配列の上流側又は下流側にヌクレオチドをいくつか追加したプローブであることができる。プローブの熱変性温度（以下、Tm値と略す）は特に規定するものではないが、通常プライマーのTmよりも約4℃以上高くする必要がある。好ましくは、プライマーのTmよりも約4℃から約10℃高いTm値をもつプローブを使用することができる。また、TaqManプローブを作製する際は、プローブの5'末端をG以外のヌクレオチドにする必要がある。さらに、プローブ中のCの割合がGの割合よりも高くすることが望ましい。さらにまた、プローブの長さは30mer以下であることが望ましい。

【0031】本プローブを用いて菌を検出・定量する際に設計するプライマーは、センス側を1番目から104番目（大腸菌16S rRNA配列のナンバリング）の間、好ましくは69番目から104番目の間で、アンチセンス側を128番目から250番目の間、好ましくは162番目から226番目の間で設計されることができる。上述のように、プライマーのTm値は、プローブのTm値よりも約4℃以上低くすること、好ましくは約4℃から約10℃低いTm値にすることが好ましい。また、高次構造を形成しないようにプライマーを設計すること、また、プライマーダイマーの形成を防止するために、プライマーの3'末端同士が相補的な配列にならないようにすることが好ましい。

【0032】

【実施例】以下の実施例において本願発明をさらに詳しく説明するが、本願発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0033】実施例1

乾燥重量1kgのドッグフードに500gのおが屑と50gの牛糞堆肥を混ぜ、含水率が60%になるように水を補給した。その試料を有機性廃棄物分解装置内に投入し、1.2L/min・DMの条件で通気してドッグフードを分解処理した。処理容器の壁温が試料温度よりも常に1℃低くなるように温度制御し、分解により生じた発酵熱を利用するようにした。ドッグフードの分解処理過

程で、CO₂の発生速度に3つのピークがあった。1つ目のピークは13時間後、2つ目のピークは17時間後、3つ目のピークは24時間後であった。そこで、各ピーク時にサンプリングし、各サンプルの菌叢について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（以下、DGGEと略す）により解析した。この結果、以下の菌群が優先的に働いていることが分かった：バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）、バチルス・サーモデニトリフィカンス（*Bacillus thermodenitrificans*）、バチルス（*Bacillus*）A10株、バチルス（*Bacillus*）A14株、及びバチルス（*Bacillus*）S1株。バチルス（*Bacillus*）A10株は、バチルス・サーモデニトリフィカンス（*Bacillus thermodenitrificans*）やバチルス・カルドキシルオリティキュ（*Bacillus caldoxylolyticu*）に近縁な種、バチルス（*Bacillus*）A14株は、バチルス・ハロジュランス（*Bacillus halodurans*）やバチルス・サーモクロアカエ（*Bacillus thermocloacae*）に近縁な種、バチルス（*Bacillus*）S1株は、バチルス・サーモスファエリカス（*Bacillus thermosphaericus*）に近縁な種と考えられた。

【0034】上記菌の各々の16S rRNA配列のVI-V2領域を解析したところ、配列番号1に示すものと同じ配列を共通に有していた。そこで、配列番号1の上流側及び下流側における変動領域の配列に基づき、各菌のプライマーセットを以下のように設計した。

バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）（增幅鎖長：85bp（配列番号21））
5'-AGCGGACAGATGGGAGCTT-3'（配列番号9）

30 5'-TTATCCCAGCTTACAGGCAGGTT-3'（配列番号10）
バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）（增幅鎖長：69bp（配列番号22））
5'-TTATCCCAGCTTACAGGCAGGTT-3'（配列番号12）
バチルスサーモデニトリフィカンス（*Bacillus thermodenitrificans*）（增幅鎖長：63bp（配列番号23））
5'-AGCTTGCTCTGTTGGCTCA-3'（配列番号13）
5'-CTTGGGGCAGGTTGC-3'（配列番号14）

40 【0036】バチルス（*Bacillus*）A10株（增幅鎖長：65bp（配列番号24））
5'-CTTGCTCTGTTGGCTTAGCG-3'（配列番号15）
5'-CCGGTCTTACGGGCAGG-3'（配列番号16）
バチルス（*Bacillus*）A14株（增幅鎖長：67bp（配列番号25））
5'-GCTCGCTCTCCTTCAGTCAG-3'（配列番号17）
5'-GGCAGTTATCCGGTCTTACAG-3'（配列番号18）
バチルス（*Bacillus*）S1株（增幅鎖長：147bp（配列番号26））
50 5'-GCTTGCTTTATGAGGTTAGC-3'（配列番号19）

5'-CGTACGAGAACCAACCTTCAACA-3' (配列番号20)

【0037】上記各菌のプライマーセットを用いて、生ゴミ処理サンプルから抽出したゲノムを錆型としてPCRをおこなった。PCRにおいては、94℃で30秒保持する熱変性工程と、58℃で30秒保持するプライマー結合工程と、72℃で1分間保持する伸長工程からなるサイクルを30回繰り返した。PCR溶液の組成を以下の表1に示す。

【0038】

【表1】

各菌のプライマーセット	0.3 μM × 2
dATP	200 μM
dGTP	200 μM
dCTP	200 μM
dTTP	200 μM
KCl	50mM
Tris-HCl (pH8.3)	10mM
MgCl ₂	2.0mM
Taq DNA ポリメラーゼ	0.025U/μL
サンプル	1 μL/50 μL

【0039】PCRにより、各菌由来のDNA断片を得ることができた。バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis)のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号21に、バチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis)のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号22に、バチルス・サーモデントリフィカンス (Bacillus*30

配列番号1に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた

定量的PCRによる各種バチルス属菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

	Bacillus subtilis	Bacillus licheniformis	Bacillus thermodenitrificans	Bacillus A10株	Bacillus A14株	Bacillus S1株
サンプル1 (13hr)	4.02×10 ³	7.70×10 ⁴	1.28×10 ⁵	3.98×10 ³	8.66×10 ³	1.25×10 ⁵
サンプル2 (17hr)	1.08×10 ⁵	5.19×10 ⁴	1.24×10 ⁵	2.89×10 ⁵	4.07×10 ⁵	3.52×10 ⁵
サンプル3 (24hr)	1.70×10 ⁵	8.48×10 ⁴	1.92×10 ⁵	7.27×10 ⁵	3.68×10 ⁵	1.19×10 ⁵

【0042】このように、配列番号1に示す配列のTaq Manプローブを用いることで、生ゴミ処理過程において働くバチルス属の各菌種を迅速に検出・定量することができ可能となった。

【0043】実施例2

デンプンを主成分とする有機性廃棄物1kgに500gのおが屑と50gの牛糞堆肥を混ぜ、含水率が60%になるように水を補給した。その試料を有機性廃棄物分解装置内に投入し、1.2L/min・DMの条件で通気して分解処理した。試料温度は50℃に保った。分解処理開

* thermodenitrificans) のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号23に、バチルス (Bacillus) A10株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号24に、バチルス (Bacillus) A14株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号25に、バチルス (Bacillus) S1株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号26に示す。得られた各菌由来のDNA断片を標準DNAとし、

10 1×10⁵ コピー数/μL、2×10⁵ コピー数/μL、5×10⁵ コピー数/μL、及び1×10⁶ コピー数/μLとなるように、各DNA断片を希釈調製した。

【0040】配列番号1に示す配列のTaq Manオリゴヌクレオチドプローブ (5'末端にFamレポーターを、3'末端にTamaragaクエンチャーを修飾したもの)を作製した。プライマーを各900μM、そしてTaq Manプローブを200μM含む、2倍希釈したTaq Man Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン製)を用いて、各菌について定量的PCRをおこなった。定量的PCRにおいては、95℃15秒の熱変性と60℃1分のプライマー結合・伸長反応を40サイクル行なった。検出・測定器として、GeneAmp 5700 (PEバイオシステムズジャパン製)を用いた。

【0041】解析した各菌の16S rRNA配列の断片数を7で割ることで、各試料中の各菌の数を求めた。各試料における各菌の定量データを以下の表2に示す。表2に示した菌数は、サンプル100mg中における値である。

【表2】

定量的PCRによる各種バチルス属菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

始後、24時間目、72時間目、及び96時間目の3点でサンプリングをおこない、各試料の菌叢について、変製剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) により解析した。この結果、紅色非硫黄細菌のβグループに属する以下の細菌が働いていることが分かった。アルカリジーン (Alcaligenes) S6株、ボルデトラ (Bordetella) S9株。

【0044】上記菌の各々の16S rRNA配列のV1-V2領域を解析したところ、配列番号8に示すものと同じ配列を共通に有していた。そこで、配列番号8の上

流側及び下流側における変動領域の配列に基づき、各菌のプライマーセットを以下のように設計した。

アルカリジーン (Alcaligenes) S 6 株 (増幅鎖長: 14 2 bp (配列番号 27))

5'-AGCCCGAGGTAAGCTTGCT-3' (配列番号 29)

5'-TGGGATCCCCCCTT-3' (配列番号 30)

Bordetella S 9 株 (増幅鎖長: 135 bp (配列番号 28))

5'-TTCGGCCTGGCGGC-3' (配列番号 31)

5'-AGAGCTCCGAAGGATCCC-3' (配列番号 32)

【0045】上記各菌のプライマーセットを用いて、生ゴミ処理サンプルから抽出したゲノムを錠型として PCR をおこなった。PCRにおいては、94°Cで30秒保持する熱変性工程と、58°Cで30秒保持するプライマー結合工程と、72°Cで1分間保持する伸長工程からなるサイクルを30回繰り返した。PCR溶液の組成は表1に示したものと同じであった。

【0046】PCRにより、各菌由来のDNA断片を得ることができた。アルカリジーン (Alcaligenes) S 6 株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号 27 に、ボルデトラ (Bordetella) S 9 株のプライマーセットを用いて増幅されたDNA断片の塩基配列を配列番号 28 に示*

配列番号 8 に示すオリゴヌクレオチドを含むプローブを用いた

定量的PCRによる菌の検出・定量
(菌数/サンプル100mg)

	Alcaligenes S6株	Bordetella S9株
サンプル 1 (24hr)	3.52×10^4	8.04×10^4
サンプル 2 (72hr)	1.80×10^4	2.24×10^4
サンプル 3 (96hr)	1.73×10^4	2.05×10^4

【0049】このように、配列番号 8 に示す配列の TaqMan プローブを用いることで、有機性廃棄物処理過程において働く紅色非硫黄細菌の β グループに属する各菌種を迅速に検出・定量することが可能となった。

【0050】

【発明の効果】本願発明は、大腸菌の 16S rRNA をコードする DNA のセンス側から数えて、104番目から 126 番目の配列 (5'-GGCGGACGGGTGACTTAATGTCTG-3') に相当する真正細菌の 16S rRNA をコードする DNA 配列又はその相補的配列を含むオリゴヌクレオチドに蛍光色素を付加したプローブと、上記プローブの上流側及び下流側に存在する変動領域の配列に基づき設計したプライマーとを用いて PCR を行ない、そして変化した※

<110> Denso Co., Ltd.

<120> A method for identifying and quantitatively determining eubacteria

<130> ND 1004228

<160> 32

<210> 1

*す。得られた各菌由来のDNA断片を標準DNAとし、 1×10^5 コピー数/ μ L、 2×10^5 コピー数/ μ L、 5×10^5 コピー数/ μ L、及び 1×10^6 コピー数/ μ Lとなるように、各DNA断片を希釈調製した。

【0047】配列番号 8 に示す配列の TaqMan オリゴヌクレオチドプローブ (5' 末端に Fam レポータを、3' 末端に Tamarack エンチャーチを修飾したもの) を作製した。プライマーを各 900 μ M、そして TaqMan プローブを 200 μ M 含む、2 倍希釈した TaqMan Universal PCR Master Mix (PE バイオシステムズジャパン製) を用いて、各菌について定量的 PCR をおこなった。定量的 PCR においては、95°C 1.5 秒の熱変性と 60°C 1 分のプライマー結合・伸長反応を 40 サイクル行なった。検出・測定器には、GeneAmp 5700 (PE バイオシステムズジャパン製) を用いた。

【0048】解析した各菌の 16S rRNA 配列の断片数を 7 で割ることで、各試料中の各菌の数を求めた。各試料における各菌の定量データを以下の表 3 に示す。表 20 3 に示した菌数は、サンプル 100 mg 中における値である。

【表 3】

※プローブの蛍光波長において蛍光強度を測定することにより、各種真正細菌群の中の特異的な種のみを検出・定量する方法を提供するものである。本願発明のプローブを用いることにより、真正細菌における全ての菌種を迅速に検出・定量することが可能となる。また、本願発明に係る検出・定量方法においては、真正細菌間で非特異的なプローブを用いることにより、バチルス属やレジオネラ菌、放線菌、肺血症原因菌、紅色非硫黄細菌の α グループや、紅色非硫黄細菌の β グループなどの検出に際して、共通のプローブを用いることができるため経済的である。

【配列表】

(10)

特開2002-51783

17

18

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 1
cacgttac tcacccgtcc gcc
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 2
tacgttac tcacccgtcc gcc
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 3
caaggattac tcacccgtcc gcc
<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 4
cacgttac tcacccgttc gcc
<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 5
tacgcgttac tcamccgtyc grc
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 6
asryrttaact caccgtccg ccrc
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 7
acgygttaact caccgtcyc ccrc
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 8
atrywtttaact caccgttcg ccact
<210> 9
<211> 19
<212> DNA

(11)

特開2002-51783

19

20

<213> Artificial Sequence
<400> 9
agcggacaga tggagctt
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 10
ttatccagt cttacaggca ggtt
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 11
cttgctccct taggtcagcg
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 12
ttatccagt cttacaggca ggtt
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 13
agcttgctct tggggc a
<210> 14
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 14
cttgcggca gggtgc
<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 15
cttgcttctg ttccgttagc g
<210> 16
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 16
ccggcgttac gggcagg
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 17

19

20

24

21

16

21

17

(12)

特開2002-51783

21

22

gctcgctc cttcagtca g
 <210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18

gcgagttatc ccggtcttac ag
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 19

gcttgcttt tatgaggta gc
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 20

ggtagcagaa ccaccttca aca
 <210> 21
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 21

agcgacaga tggagcttgc cccctgatg ttagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg 60
 taacctgcct gtaagactgg gataa 85

<210> 22
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> *Bacillus licheniformis*
 <400> 22

cttgctccct taggtcagcg gcggacgggt gagtaacacg tggtaacct gcctgtt 60
 ctggataa 69

<210> 23
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> *Bacillus thermodenitrificans*
 <400> 23

agcttgctct tgtttggtc agcggcggac gggtgagtaa cacgtggca acctgcccgc 60
 aag 63

<210> 24
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> *Bacillus A10*
 <400> 24

cttgcttctg ttcggttagc ggccggacggg tggtaacac gtggtaacc tgccgtaa 60
 accgg 65

<210> 25
 <211> 77
 <212> DNA

(13)

23
<213> Bacillus A14
<400> 25
gctcgcttc cttcagtca gcggcggacg ggtgagtaac acgtggtaa cctgcctgtaa 60
agaccgg 67
<210> 26
<211> 147
<212> DNA
<213> Bacillus S1
<400> 26
gcttgcttt tatgaggtaa gcggcggacg ggtgagtaac acgtggtaa cctgccttat 60
agaccggat aactcgcggaa aacgcgtgct aataccggat aacacagcg 120
ccgggtgtaa aagggtgttc tgctacc 147
<210> 27
<211> 142
<212> DNA
<213> Alcaligenes S6
<400> 27
agcgcgaggta aagcttgctt accttggcg 147
cgagtggcga acgggtgagt aatgtatcg 60
aacgtgccc 120
gtagcggggataaactac 135
gaaagagtgg ctaataccgc atacgccta
cgggggaaag ggggggatcg ca
<210> 28
<211> 135
<212> DNA
<213> Bordetella S9
<400> 28
ttcggcctgg cggcgagtgg cgaacgggtg agtaatgc 135
cat cggAACGTGC ccagtatgg 60
gggataacca cgcgaaagcg tggctaatac cgcatacgcc 120
tttagggggaa 147
tccttcggaa cctct
<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 29
agcgcgaggta aagcttgct 19
<210> 30
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 30
tgcgatcccc cccttt 16
<210> 31
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 31
ttcggcctgg cggc 14
<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

特開2002-51783

24

(14)

25
<400> 32
agaggtcccg aaggatccc

特開2002-51783
26

19

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	マーク (参考)
G 0 1 N	33/569	G 0 1 N	33/58
	33/58	C 1 2 N	15/00
			Z N A A

F ターム(参考) 2G045 AA28 AA35 CB21 DA12 DA13
DA14 FB01 FB02 FB07 FB12
GC15
2G054 AA07 AB02 AB05 BB08 CA20
CA22 CE02 EA03 GA04 GB02
4B024 AA11 AA13 CA09 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ50 QR08
QR32 QR42 QR55 QR62 QS25
QS34 QX02